

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-228272

(43)Date of publication of application : 07.10.1987

(51)Int.Cl.

C12N 9/96

(21)Application number : 61-069594

(71)Applicant : AMANO PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 27.03.1986

(72)Inventor : YOSHIDA KAZUO

(54) STABLE PEROXIDASE FORMULATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent inactivation of peroxidase in formulation processing and preservation of solutions, by the coexistence of a specific substance, e.g. ascorbic acid, xanthan gum, etc., as a stabilizer for the peroxidase.

CONSTITUTION: A substance containing one or two or more of ascorbic acid, xanthan gum, tamarind seed polysaccharide and guar seed polysaccharide is used as a stabilizer for peroxidase. For the ascorbic acid and a salt thereof, the amount thereof added is preferably 0.5W5mg based on 200 units peroxidase activity and 0.005W0.03% based on the total weight of the formulation. For the xanthan gum, tamarind seed polysaccharide or guar seed polysaccharide, the amount thereof added is preferably 0.01W0.1% based on the total weight of the formulation.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228272

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和62年(1987)10月7日

C 12 N 9/96

7421-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑬ 発明の名称 安定なベルオキシダーゼ製剤

⑭ 特 願 昭61-69594

⑮ 出 願 昭61(1986)3月27日

⑯ 発 明 者 吉 田 和 夫 名古屋市市中川区富田町万場1126番地

⑰ 出 願 人 天野製薬株式会社 名古屋市中区錦1丁目2番7号

明 細 書

1. 発明の名称

安定なベルオキシダーゼ製剤

2. 特許請求の範囲

1 ベルオキシダーゼとアスコルビン酸類、キサントングム、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を含有する水性又は乾性組成物からなることを特徴とする安定なベルオキシダーゼ製剤。

2 ベルオキシダーゼの造粒工程でアスコルビン酸類、キサントングム、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を添加する特許請求の範囲第1項記載の安定なベルオキシダーゼ製剤。

3 アスコルビン酸類を0.005～0.03%添加する特許請求の範囲第1項又は第2項記載の安定なベルオキシダーゼ製剤。

4 キサントングム、タマリンド種子多糖類又はグア種子多糖類を0.01～0.1%添加する特許請求の範囲第1項又は第2項記載の安定なベルオキ

シダーゼ製剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は安定なベルオキシダーゼ製剤に関する。更に詳細には、ベルオキシダーゼとアスコルビン酸類、キサントングム、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を含有する水性又は乾性組成物からなる安定なベルオキシダーゼ製剤に関する。

ベルオキシダーゼは、過酸化水素存在下に種々の化合物を酸化する酵素で、本発明の該製剤は研究試薬、臨床診断における酵素分析や免疫分析の他、食品分野に於いて中広く利用されうる。

従来の技術

ベルオキシダーゼを安定化せしめた技術としては、ホウ酸イオン生成物質を含有する安定なベルオキシダーゼ組成物(特開昭55-54895)、ミエロベルオキシダーゼにクエン酸又はその塩を添加した粉末製剤(特開昭59-2686)、ベルオキシダーゼに血清蛋白質及びポリアルキレングリコール

を含む酵素組成物（特開昭59-210885）、ミエロベルオキシダーゼにアルブミンを添加した粉末製剤（特開昭58-13521）、炭素数1乃至5ケを有する低級アルコールの少なくとも1つを含む酵素溶液の安定化（特開昭55-13008）、グルタチオンベルオキシダーゼに五、六炭糖、五、六価糖アルコール及び二糖類のうちの少なくとも1つを含有する酵素組成物（特開昭58-9688）、ハプテン、抗原、抗体、又は結合タンパクとのコンジュゲートしたベルオキシダーゼ組成物（アメリカ特許第4,504,579号）、フェリシアン化カリウムによる安定化（J.Histochem.Cytochem.,32巻,1005頁,1984年）、カルシウムイオンによる熱安定性の向上（Bioorg.Khim.,7巻,75頁,1981年）、トリトンX-100、ツイーン界面活性剤による安定化（Z.Med.Laboratoriumsdiagn.,21巻,180頁,1980年）、硫酸鉄、マンニトール、ポリエチレングリコール、ラクトアルブミンを含むベルオキシダーゼ含有物の安定化（ドイツ特許第2,742,699号）等が報告されている。

となりうる無害で且つそれ自身安定な、食品、臨床検査診断用に好適な物質を種々検討した。

そしてアスコルビン酸類、キサントンガム、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を含む物質がベルオキシダーゼの製剤化に伴う失活並びに溶液保存における失活を防止し点滅した安定化効果がみられ、又経時的な安定性にも寄与することを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明で使用するベルオキシダーゼは、種々の起源のものから得られ、例えば西洋ワサビ、ダイコン、カブ、コムギ胚、コメ胚、サツマイモ、グイズ子葉、タケノコ等植物起源のものや、血液及びその構成成分の白血球、乳汁、甲状腺、小腸、唾液等動物由来のもの及び酵母、細菌などの微生物起源のものも用いることができる。具体的に示せば、西洋ワサビベルオキシダーゼ、ミエロベルオキシダーゼ、ラクトベルオキシダーゼ、グルタチオンベルオキシダーゼ、チトクロムCベルオキシダーゼ、クロロベルオキシダーゼ、ブロムベル

発明が解決しようとする問題点

上記のようにベルオキシダーゼの安定化に関しては種々の報告がなされているが、これらの安定化剤は製剤化特に練合、造粒、乾燥といった圧力及び熱に対しての安定化には殆ど寄与しない。又、長期間の溶液保存によるベルオキシダーゼの失活を有効に防止した安定化剤はない。更に、上記安定化剤の中には、食品用としては有害で使用できなかったり、検査用の試薬として用いるには反応系を妨害して使用に耐えないなどの問題がある。

そこで本発明は、かかる欠点を補うべくベルオキシダーゼの製剤加工、溶液保存に於ける著しい失活を防ぎ且つ該製剤の保存・管理においてその活性を長期間にわたり維持せしめることを目的とし、食品分野の他、臨床診断用の酵素製剤として使用できる安定なベルオキシダーゼ製剤をうることにある。

問題点を解決するための手段

本発明者らは、ベルオキシダーゼの安定化剤

オキシダーゼ、NAD(P)Hベルオキシダーゼ等が挙げられる。

上記酵素は、酵素精製の常套手段によりその使用用途に応じて粗酵素から高純度精製酵素までの純度を任意に調整しうる。

ベルオキシダーゼを製剤加工するに際し用いられる安定化剤としては、アスコルビン酸類、キサントンガム、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を含む物質が挙げられる。アスコルビン酸類とはアスコルビン酸及びその塩を含むことを示す。キサントンガムは微生物 *Xanthomonas campestris* が産生する多糖類（分子量200万）であり、タマリンド種子多糖類とはタマリンド種子から得られる多糖類例えばグリロイド（登録商標）（分子量65万）であり、グア種子多糖類とはグア種子から得られる多糖類例えばグアバック（登録商標）（分子量20万～30万）等が挙げられる。このうち、特にキサントンガムが好ましく用いられる。

使用される量としては、アスコルビン酸及びそ

の塩においてはベルオキシダーゼ活性200単位に対し0.5～5 mg、好ましくは1～2 mgであり、製剤全量に対しては0.005～0.03%である。0.03%以上では活性測定における反応系を阻害したり、安定化が損なわれる為使用できない。

キサントガム、タマリンド種子多糖類又はグア種子多糖類は製剤全量に対して0.01～0.1%添加することが好ましい。0.1%以上ではこれら多糖類の粘性増加に伴い、特に造粒が困難となる。

本発明のベルオキシダーゼ製剤は、その性状が顆粒状、細粒状等の乾性組成物でもよいが、液状のものであっても何等差し支えるものではない。又、この液状組成物を凍結乾燥、真空乾燥等の乾燥手段により乾性組成物にすることも制限されるものではない。

ベルオキシダーゼ製剤をうるには、賦形剤と酵素を含む混合粉末に結合剤を添加し、練合して造粒し、顆粒剤又は細粒剤にすることが適当である。

ここで用いられる造粒の種類は、その機能を生かすものであるならば如何なるものでもよいが例

えば押し出し造粒、オシレーター造粒、転動造粒、流動層造粒、噴霧造粒等を挙げることができる。又、造粒に際して使用する溶剤はアルコール類でもよいが水が最も好ましい。水で造粒することにより、安定化剤による効果が顕著にみられることや賦形剤に水系のものが使用できること、加えるにコストの低減が図れるメリットを有するのである。

ここで好ましい実施態様の一つである押し出し造粒法によるベルオキシダーゼ製剤について説明する。

まず、乳糖、アビセル、沈降炭酸カルシウム、バレイショ澱粉、トウモロコシ澱粉、デキストリン、合成ケイ酸アルミニウムなどの賦形剤にベルオキシダーゼ溶液又は凍結乾燥粉末を添加して均等に混和する。しかるのち、アラビアゴム、ゼラチン、ブドウ糖、寒天、グラニュー糖、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナ

トリウム、ポリビニルピロリドン、澱粉などの結合剤を水又は緩衝液に溶解した液及び安定化剤であるアスコルビン酸類、キサントガム、グリロイド（登録商標）、グアバック（登録商標）の一種又は二種以上を含む溶液を上記の混合粉末に加えてニーダー中に入れ、30分程度よく練合する。これらを押し出し造粒機でスクリーン径約0.5～1.0 mmにて造粒する。この場合の造粒には、ロータリー型、スクリュウ型、ペレットミル型の造粒機が用いられる。

調製された顆粒は、通常用いられる乾燥機例えば流動乾燥機で50～70℃、好ましくは55～65℃で約30分乾燥すればよい。

溶剤はベルオキシダーゼを水又は緩衝液に溶解して安定化剤を添加溶解した後、防腐剤を0.01%程度加えて調製される。この溶液の中には、臨床検査測定に必要とされる酵素、色素（発色団）、界面活性剤なども含有させることができる。

かくして、上記の製剤加工工程での加圧及びそれに伴う熱発生、溶液保存などによる酵素活性の

損失を未然に防止し、活性を保持したままの安定なベルオキシダーゼ製剤を得ることが可能となった。加えて、該製剤は経時的に安定であるため、長期間にわたり品質の維持を保証するものである。

ベルオキシダーゼの活性測定は以下の方法により測定した。

試薬

(1) 緩衝液 リン酸水素一カリウム1.36g、5%フェノール3 ml及び5%トリトンX-100 3 mlを水50 mlに溶解し、2 N-水酸化ナトリウム溶液でpHを7.00に調整した後水を加えて正確に100 mlとする。

(2) 過酸化水素試液 過酸化水素水（過酸化水素31%含有）0.1 mlに水を加えて正確に100 mlとする。

(3) 4-アミノアンチピリン試液 4-アミノアンチピリン40 mgに水を加えて正確に100 mlとする。

酵素溶液

500 nmにおける1分間の吸光度変化が0.02になるように、0.1 Mリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解する。

反応方法

緩衝液 2 ml、過酸化水素試液 1 ml、4-アミノアンチピリン試液 0.1 ml 及び酵素溶液 0.1 ml をキューベットに入れ、37℃で反応させ 2 分後及び 4 分後の吸光度を測定する。

酵素活性単位

ここで 1 単位とは、1 分間に 1 μ mole のキノンイミン色素を生成する酵素量をいう。

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

乳糖 100g にベルオキシダーゼ (200 単位/mg, 天野製薬製) 15mg を添加してよく混合し、アスコルビン酸ナトリウム (田辺製薬製) 15mg を含む 1% アラビアゴム末水溶液 10ml を加え練合して押し出し造粒機 (不二パウダル製, EXK-1 型) でスクリーン 0.8 mm にて造粒した。できた顆粒は、流動乾燥機 (不二パウダル製, DP-10 型) に入れ 60℃ で 20 分間乾燥した。

ベルオキシダーゼ (250 単位/mg, 天野製薬製) 50mg にキサントガム (大日本製薬製) 0.15g を加え、これをトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 100 ml に溶解して凍結乾燥し、篩過して粉末製剤を得た。

実施例 6

乳糖 200g にベルオキシダーゼ (50 単位/mg, 天野製薬製) 30mg を水 10ml に溶解した液を添加混合し、これにアスコルビン酸 (田辺製薬製) 10 mg 及びキサントガム (大日本製薬製) 50mg を含む 0.5% ヒドロキシプロピルセルロース (信越化学製) 10ml を加えニーダーにて練合し、以下実施例 1 と同様に操作して顆粒剤を得た。

試験例 1

実施例 1 及び 2 で得られた顆粒剤の酵素活性を測定した。なお、コントロールは安定化剤を添加しないものとした。結果を第 1 表に示す。

これから判るように、アスコルビン酸ナトリウム及びキサントガムは顕著な製剤加工工程における安定化効果をもたらしている。

実施例 2

乳糖 100g にベルオキシダーゼ (200 単位/mg, 天野製薬製) 15mg を添加してよく混合し、キサントガム (大日本製薬製) 50mg を含む 1% アラビアゴム末水溶液 10ml を加え、以下実施例 1 と同様に処理して顆粒剤を得た。

実施例 3

バレイショ澱粉 120g にベルオキシダーゼ (100 単位/mg, 天野製薬製) 20mg を添加してよく混合し、これにグリロイド (登録商標, 大日本製薬製) 50mg を含む 1% ゼラチン水溶液 20ml を加えて 15 分間練合し、以下実施例 1 と同様に処理して顆粒剤を得た。

実施例 4

ベルオキシダーゼ (250 単位/mg, 天野製薬製) 50mg にアスコルビン酸 (田辺製薬製) 70mg を添加し、これを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) 100 ml (防腐剤を含む) に溶解して溶液剤を調製した。

実施例 5

第 1 表

| 添 加 剤 | ベルオキシダーゼの 残存活性 (%) |
|------------|-----------------------|
| 無 | 7 |
| アスコルビン酸 Na | 84 |
| キサントガム | 97 |

試験例 2

安定化剤の濃度及び結合剤の種類を変えて造粒し、調製された顆粒剤の酵素活性を調べた。結果を第 2 表に示す。括弧内の数値は、結合剤にゼラチンを使用した時のものであり、他は全てアラビアゴム末を用いた。

これから明らかなように、アスコルビン酸ナトリウム 10 乃至 20mg 及びキサントガムは顕著な効果がみられ、ベルオキシダーゼの製剤加工における失活を未然に防止していることが判る。又、グリロイド (登録商標)、グアバック (登録商標) も無添加の場合に比べると安定化効果がみられた。

第 2 表

| 添 加 剤 | ベルオキシダーゼの 残存活性 (%) |
|------------------------------------|-----------------------|
| 無 | 5 |
| アスコルビン酸 Na 10mg | 85 (86) |
| アスコルビン酸 Na 20mg | 80 (88) |
| アスコルビン酸 Na 30mg | 50 (81) |
| アスコルビン酸 Na 60mg | 56 (66) |
| キサントングム 25mg | 75 |
| キサントングム 50mg | 98 |
| キサントングム 100mg | 95 |
| グリロイド 25mg | 35 |
| グリロイド 50mg | 43 |
| グリロイド 100mg | 45 |
| グアバック 25mg | 30 |
| グアバック 100mg | 42 |
| グリロイド 25mg + アスコル ビン酸ナトリウム 30mg | 76 |
| キサントングム 25mg + グアバック 25mg | 90 |

凍結乾燥粉末は従来安定化剤として報告されたホウ酸、クエン酸及び可溶性澱粉よりも優れた安定化効果がみられる。

第 4 表

| 添 加 剤 | 経 変 日 数 (日) | | | | | |
|------------|---------------|-----|----|----|-----|-----|
| | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| ベルオキシダーゼ溶液 | 100 | 100 | 95 | 98 | 92 | 90 |
| ホ ウ 酸 | 95 | 73 | 70 | 65 | 67 | 65 |
| ク エ ン 酸 | 87 | 70 | 63 | 57 | 58 | 53 |
| 可 溶 性 澱 粉 | 90 | 78 | 70 | 63 | 66 | 60 |
| ベルオキシダーゼ粉末 | 96 | 86 | 75 | 63 | 60 | 61 |
| ホ ウ 酸 | 98 | 73 | 56 | 45 | 40 | 42 |
| ク エ ン 酸 | 87 | 69 | 51 | 42 | 40 | 37 |
| 可 溶 性 澱 粉 | 91 | 78 | 57 | 47 | 43 | 40 |

発明の効果

本発明は、製剤加工や溶液での保存により不安定となったベルオキシダーゼをアスコルビン酸類、タマリンド種子多糖類、グア種子多糖類の一種又は二種以上を添加することによって安定化せ

試験例 3

試験例 1 で用いた顆粒剤の 40℃ に於ける経時的変化をみた。残存活性 (%) の結果を第 3 表に示す。

これからわかるように、本発明のベルオキシダーゼ製剤は長期間にわたり安定であることが判る。

第 3 表

| 添 加 剤 | 経 変 日 数 (日) | | | | | |
|------------|---------------|----|----|----|-----|-----|
| | 15 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 |
| 無 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0.8 | 0.5 |
| アスコルビン酸 Na | 80 | 72 | 70 | 68 | 67 | 64 |
| キサントングム | 92 | 82 | 80 | 77 | 76 | 80 |

試験例 4

実施例 4 及び実施例 5 の溶液又は凍結乾燥粉末について、ベルオキシダーゼ活性の経時的変化を調べた。比較として、ホウ酸、クエン酸及び可溶性澱粉を同量用いた。

残存活性の結果を第 4 表に示す。尚、溶液については 4℃ で、凍結乾燥粉末は 37℃ で保存した。

これからわかるように、ベルオキシダーゼの溶液及び

しめ、さらに長期間にわたり優れた品質を保持することができる利点を併せもつ製剤である。よって、該製剤は食品用並びに臨床検査用として有利に使用しうる。

特許出願人 天野製菓株式会社